

Adsorção de Peroxidase em Resina de Troca Iônica: Efeito do pH e da Solução Tamponante

**Gabrielle Victoria Gautério¹, Laís Reginatto¹, Jaqueline Garda Buffon¹ e
Susana Juliano Kalil¹**

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Caixa Postal 474 – CEP 96203-900 Rio Grande – RS - E-mail: gabriellevgauterio@gmail.com

RESUMO

As peroxidases são enzimas que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio e de outros compostos orgânicos. Diversas técnicas são empregadas na purificação de peroxidases, onde se destaca a cromatografia de troca iônica em leito expandido, a qual oferece vantagens como maior produtividade de processo e interação entre o adsorvente e a molécula de interesse. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do pH e da solução tamponante na adsorção de peroxidase em resina de troca iônica. Neste estudo, foi verificado que a condição mais favorável de solução tamponante e pH a ser utilizada na posterior purificação da peroxidase correspondeu ao tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5.

Palavras-chave: cromatografia, farelo de arroz, leito expandido, Streamline™ SP.

INTRODUÇÃO

As peroxidases (CE 1.11.1.X) são enzimas que catalisam a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos tendo o peróxido de hidrogênio como molécula aceptora (MATHÉ et al., 2010). Estas enzimas podem ser extraídas de diversas fontes como de animais, plantas e micro-organismos. Possuem inúmeras aplicações incluindo o tratamento de contaminantes fenólicos na presença de peróxido de hidrogênio (DEVA et al., 2014), elaboração de imunoenaios enzimáticos (VDOVENKO et al., 2010), elaboração de kits de diagnóstico (DUTTA et al., 2013), síntese de polímeros (SAKAI et al., 2014) e degradação de micotoxinas (GARDA-BUFFON; KUPSKI; BADIALE-FURLONG, 2011). Dependendo do uso final das peroxidases, é necessário estas sejam submetidas a um processo de purificação.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a purificação de peroxidase tais como precipitação por sais ou solventes orgânicos, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico, partição trifásica e técnicas cromatográficas em geral. Recentemente, o uso da cromatografia de troca iônica em leito expandido se mostra como alternativa na obtenção de peroxidase purificada, visto que esta técnica proporciona a purificação da enzima através de um único processo (GAUTÉRIO et al., 2015). A cromatografia de troca iônica se baseia na interação entre os íons presentes na fase móvel (solução tamponante, molécula de interesse e contaminantes) e os grupos carregados presentes no trocador iônico (CUTLER, 2004). Quando operada em modo expandido, esta técnica oferece vantagens como aumento da produtividade do processo e maior interação adsorvente-molécula alvo (TOLEDO et al., 2007).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do pH e da solução tamponante na adsorção de peroxidase em resina de troca iônica, visando à posterior purificação da enzima por cromatografia em coluna de leito expandido.

MATERIAL E MÉTODOS

A extração da peroxidase foi realizada a partir de farelo de arroz integral (granulometria inferior a 0,425 mm) e solução tampão fosfato de sódio 0,040 mol/L em pH 5,0, na proporção 1:10, respectivamente. O extrato permaneceu sob agitação orbital (100 rpm) a 25°C, durante 60 min. Após, o extrato foi centrifugado (3300xg) a 4°C por 10 min, e filtrado em sistema a vácuo, tendo-se assim o extrato clarificado de peroxidase (FELTRIN, 2013).

Para avaliar o efeito do pH e da solução tamponante na adsorção de peroxidase, foi utilizada a resina de troca catiônica Streamline™ SP da GE Healthcare Life Science (Uppsala, Suécia). Os ensaios foram realizados em frascos erlenmeyers sob agitação orbital (150 rpm) a 25°C por 30 min, os quais continham a resina de troca iônica, a solução tamponante e o extrato clarificado de peroxidase na proporção 1:1:10, respectivamente. No início de cada ensaio, a resina foi equilibrada com as soluções tamponantes fosfato de sódio 0,025 mol/L em pH 5,0 a 7,0; acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 3,5 a 5,5; e citrato-fosfato de sódio 0,025 mol/L em pH 3,5 e 7,0. O pH do extrato clarificado de peroxidase também foi ajustado aos valores a serem estudados. Em todos os ensaios, as atividades enzimáticas de peroxidase inicial (anterior à realização do ensaio) e final (após o ensaio) foram determinadas (SALA et al., 2014). Posteriormente, a atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida (q^*) foi calculada conforme a Equação 1:

$$q^* = \frac{(A_i \cdot V_{\text{extrato}}) - (A_f \cdot V_{\text{total}})}{V_{\text{resina}}} \quad (1)$$

onde A_i (U/mL) é a atividade enzimática inicial, A_f (U/mL) é a atividade enzimática da peroxidase livre na fase líquida, V_{extrato} (mL) é o volume de extrato enzimático, V_{resina} (mL) é o volume de resina e V_{total} (mL) é o volume total adicionado ao erlenmeyer. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Além disso, foi conduzido um ensaio controle que consistiu na adição do extrato enzimático ao sistema sem a resina de troca iônica.

A atividade enzimática de peroxidase foi determinada conforme Devaiah e Shetty (2009) com modificações. A 1 mL de extrato enzimático clarificado, foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,005 mol/L em pH 5,5, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de solução de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08%. A mistura reacional permaneceu em banho termostático a 25°C por 20 min. Logo após, a transmitância foi lida em espectrofotômetro a 470 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Uma unidade da atividade de peroxidase (U) representa a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de guaiacol ($\epsilon = 26600 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em 1 min.

Os resultados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. A análise estatística foi realizada considerando o nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores de atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida (q^*), nas três condições de solução tamponante estudadas.

Conforme exposto na Tabela 1, os valores de q^* tendem a aumentar conforme a diminuição do pH, independente da solução tamponante utilizada. Apesar de não haver estudos sobre o ponto isoelétrico da peroxidase de farelo de arroz, a literatura relata que as peroxidases catiônicas de vegetais apresentam ponto isoelétrico acima do pH 8,0 (DAS; SHARMA; MISHRA, 2011). Deste modo, valores de pH distantes do ponto isoelétrico possibilitam o processo de

adsorção, já que nestas condições a enzima apresenta carga líquida positiva. Dentre todos os ensaios realizados, foi verificado maior valor de q^* em pH 4,5 para tampão citrato-fosfato de sódio 0,025 mol/L. Este resultado não se diferiu estatisticamente dos ensaios em pH 4,0 e 5,0 para tampão citrato-fosfato de sódio 0,025 mol/L, e pH 4,0 e 4,5 para tampão acetato de sódio 0,025 mol/L. Considerando a queda inerente de pH durante a passagem do extrato enzimático pela coluna cromatográfica de leito expandido, o uso de solução tamponante com pH extremamente ácido pode levar à desnaturação da enzima. Logo, as condições de pH 4,5 para tampão acetato de sódio ou citrato-fosfato de sódio, e pH 5,0 para tampão citrato-fosfato de sódio, são mais favoráveis para posterior purificação de peroxidase por cromatografia de troca iônica.

Tabela 1 - Valores de atividade enzimática no equilíbrio da peroxidase adsorvida na fase sólida (q^*).

	pH	q^* (U/mL de resina)
Tampão fosfato de sódio	7,0	$0,57^i \pm 0,18$
	6,5	$1,33^{gh} \pm 0,05$
	6,0	$2,16^{def} \pm 0,06$
	5,5	$2,37^{cde} \pm 0,05$
	5,0	$2,63^{bc} \pm 0,04$
Tampão acetato de sódio	5,5	$2,24^{def} \pm 0,06$
	5,0	$2,63^{bc} \pm 0,02$
	4,5	$2,68^{abc} \pm 0,08$
	4,0	$2,68^{abc} \pm 0,16$
	3,5	$2,46^{cd} \pm 0,03$
Tampão citrato-fosfato de sódio	7,0	$1,12^h \pm 0,07$
	6,5	$1,64^g \pm 0,12$
	6,0	$2,07^{ef} \pm 0,16$
	5,5	$1,99^f \pm 0,15$
	5,0	$2,68^{abc} \pm 0,08$
	4,5	$3,00^a \pm 0,20$
	4,0	$2,87^{ab} \pm 0,06$
	3,5	$2,44^{cd} \pm 0,03$

*Média de três valores com desvio padrão. Letras iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A capacidade tamponante e a composição dos íons presentes na solução tampão também são importantes na escolha da fase móvel utilizada na cromatografia de troca iônica. A capacidade tamponante está relacionada com o valor de pK_a que cada solução tampão possui, e recomenda-se que seu valor seja $\pm 0,5$ unidades em relação ao pH de trabalho, evitando oscilações de pH durante o processo de purificação. O pK_a da solução tampão fosfato é mais elevado ($pK_a = 7,0$) em comparação ao pK_a das soluções tampão de acetato e citrato-fosfato ($pK_a = 4,7$ para ambas) (JANSON, 2011), indicando que o uso de tampão fosfato de sódio como fase móvel poderia conduzir a resultados desfavoráveis na etapa de eluição devido a grande variação de pH. Quanto aos íons presentes na solução tampão, Kopaciewicz e Regnier (1983) verificaram que os ânions citrato provocam maior retenção de certas proteínas em relação aos

ânions acetato e fosfato. Com base nestas observações, a escolha do tampão acetato como fase móvel pode facilitar o processo de eluição, contribuindo para maior recuperação de peroxidase no final do processo.

CONCLUSÕES

Através deste estudo, foi possível concluir que a condição mais favorável de solução tamponante e pH a serem utilizadas na purificação de peroxidase correspondeu ao tampão acetato de sódio 0,025 mol/L em pH 4,5, onde se obteve q^* de 2,68 U/mL de resina.

Agências de Fomento: Capes e CNPq.

REFERÊNCIAS

- CUTLER, P. **Protein Purification Protocols**, Humana Press, United States, 2004.
- DAS, M.K.; SHARMA, R.S.; MISHRA, V. A novel cationic peroxidase (VanPrx) from a hemi-parasitic plant (*Viscum angulatum*) of Western Ghats (India): Purification, characterization and kinetic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 63-70, 2011.
- DEVA, A. N.; ARUN, C.; ARTGANAREESWARA, G.; SIVASHANMUGAM, P. Extraction of peroxidase from waste Brassica oleracea used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1148-1154, 2014.
- DEVAIAH, S.P.; SHETTY, H.S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119-126, 2009.
- DUTTA, A. K.; MAJI, S. K.; BISWAS, P.; ADHIKARY, N. New peroxidase-substrate 3,5-di-tert-butylcatechol for colorimetric determination of blood glucose in presence of Prussian Blue-modified iron oxide nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 177, p. 676-683, 2013.
- FELTRIN, A. C. P. **Aplicação da peroxidase para a degradação de deoxinivalenol**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.
- GAUTÉRIO, G.V.; FERNANDES, S.S.; MOLON, F.O.; SILVEIRA, F.S.; BUFFON, J.G.; KALIL, S.J. Purification of peroxidase from rice bran using expanded-bed ion-exchange chromatography. **Adsorption Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 153-164, 2015.
- GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, E. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 198-203, 2011.
- JANSON, J.. **Protein purification : principles, high resolution methods, and application**, John Wiley and Sons, United States, 2011.
- KOPACIENWICZAND, W.; RJZGNIE, F.E. Mobile phase selection for the high-performance ion-exchange chromatography of proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 133, p. 251-259, 1983.
- MATHÉ, C.; BARRE, A.; JOURDA, C.; DUNAND, C. Evolution and expression of class III peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 58-65, 2010.
- SAKAI, S.; KHANMHAMMADI, M.; KHOSHFETRAT, A. B.; TAYA, M. Horseradish peroxidase-catalyzed formation of hydrogels from chitosan and poly(vinyl alcohol) derivatives both possessing phenolic hydroxyl groups. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 404-409, 2014.
- SALA, L.; FIGUEIRA, F.S.; CERVEIRA, G.P.; MORAES, C.C.; KALIL, S.J. Kinetics and Adsorption Isotherm of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* on Ion-exchange Resins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 1013-1022, 2014.
- TOLEDO, A. L.; SEVERO-JR, J. B.; SOUZA, R. R.; CAMPOS, E. S.; SANTANA, J. C. C.; TAMBOURGI, E. B. Purification by expanded bed adsorption and characterization of α -amylases FORILASE NTL from *A. niger*. **Journal of Chromatography B**, v. 846, p. 51-56, 2007.
- VDOVENKO, M. M.; ZUBKOV, A.V.; KUZNETSOVA, G. I.; CIANA, L. D.; KUZMINA, N. S.; SAKHAROV, I. Y. Development of ultra-sensitive soybean peroxidase-based CL-ELISA for the determination of human thyroglobulin. **Journal of Immunological Methods**, v. 362, p. 127-130, 2010.